

31.08.2004

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

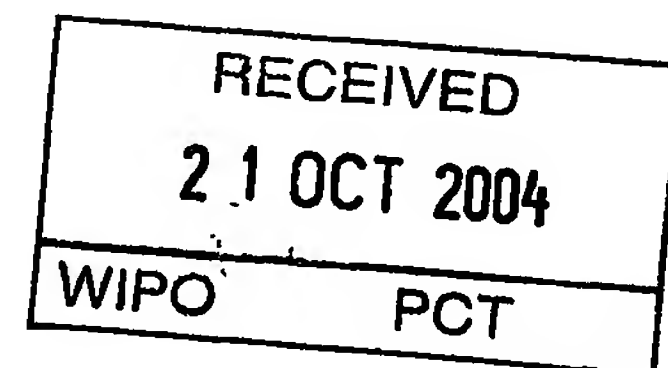
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 8月29日

出願番号
Application Number: 特願2003-306906

[ST. 10/C]: [JP 2003-306906]

出願人
Applicant(s): 独立行政法人物質・材料研究機構
株式会社日立製作所

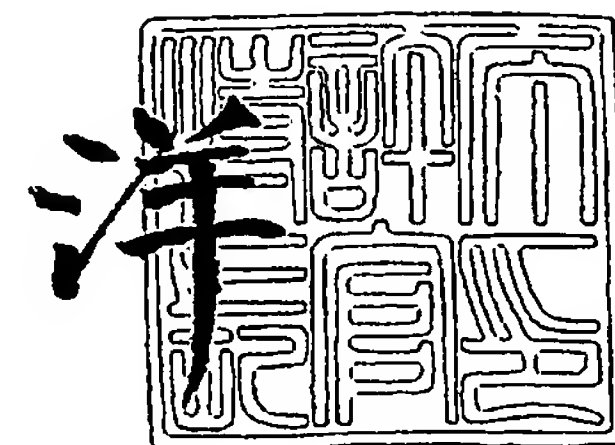


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年10月 7日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



出証番号 出証特2004-3090285

【書類名】 特許願
【整理番号】 P03-0686
【提出日】 平成15年 8月29日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 15/09
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県つくば市千現一丁目 2 番 1 号 独立行政法人物質・材料研
 究機構内
 【氏名】 宮原 裕二
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県つくば市千現一丁目 2 番 1 号 独立行政法人物質・材料研
 究機構内
 【氏名】 坂田 利弥
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目 2 8 0 番地 株式会社 日立製作
 所 中央研究所内
 【氏名】 釜堀 政男
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目 2 8 0 番地 株式会社 日立製作
 所 中央研究所内
 【氏名】 矢澤 義昭
【特許出願人】
 【識別番号】 301023238
 【氏名又は名称】 独立行政法人物質・材料研究機構
【特許出願人】
 【識別番号】 000005108
 【氏名又は名称】 株式会社 日立製作所
【代理人】
 【識別番号】 100091096
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 平木 祐輔
【持分の割合】 50/100
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 015244
 【納付金額】 10,500円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 9003115

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

絶縁膜中に埋設されたゲート電極を有する絶縁ゲート電界効果トランジスタと、
前記絶縁膜の表面に形成され、生体分子プローブが固定化されたプローブ固定化電極と

、
前記ゲート電極と前記プローブ固定化電極とを電氣的に接続する接続配線とを備え、
前記プローブ固定化電極に生体分子プローブが固定化された領域は、前記ゲート電極の直上位置から離れた位置にあることを特徴とする生体分子検出素子。

【請求項 2】

請求項 1 記載の生体分子検出素子において、前記プローブ固定化電極は前記ゲート電極の直上位置から前記絶縁膜の膜面に沿って前記生体分子プローブ固定化領域まで設けられ、前記接続配線は前記ゲート電極の直上位置で前記プローブ固定化電極と接続されていることを特徴とする生体分子検出素子。

【請求項 3】

請求項 1 記載の生体分子検出素子において、前記プローブ固定化電極は前記ゲート電極の直上位置から離れた位置に設けられ、前記接続配線は前記絶縁膜中に膜面に沿って設けられていることを特徴とする生体分子検出素子。

【請求項 4】

請求項 1～3 のいずれか 1 項記載の生体分子検出素子において、前記生体分子プローブは核酸、ポリヌクレオチド又は合成オリゴヌクレオチドであることを特徴とする生体分子検出素子。

【請求項 5】

請求項 1～4 のいずれか 1 項記載の生体分子検出素子において、前記プローブ固定化電極は金、白金、パラジウム、チタン、クロム、アルミニウム、ポリシリコン、タンタル、モリブデン、又はこれらの材料を複数組み合わせた材料からなることを特徴とする生体分子検出素子。

【請求項 6】

請求項 1～5 のいずれか 1 項記載の生体分子検出素子において、前記絶縁膜中に送受信用のアンテナが形成されていることを特徴とする生体分子検出素子。

【請求項 7】

共通の絶縁膜中に埋設されたゲート電極をそれぞれ有する複数の絶縁ゲート電界効果トランジスタと、

前記絶縁膜の表面に形成され、生体分子プローブが固定化された複数のプローブ固定化電極と、

前記複数の絶縁ゲート電界効果トランジスタの各ゲート電極と前記複数のプローブ固定化電極とをそれぞれ電氣的に接続する複数の接続配線とを備え、

前記プローブ固定化電極に生体分子プローブが固定化された領域は、前記ゲート電極の直上位置から離れた位置にあることを特徴とする生体分子検出素子。

【請求項 8】

請求項 7 記載の生体分子検出素子において、前記共通の絶縁膜中に送受信用のアンテナが形成されていることを特徴とする生体分子検出素子。

【請求項 9】

請求項 6 又は 8 記載の生体分子検出素子において、演算回路、記憶回路、受信回路、送信回路、電源回路を備えることを特徴とする生体分子検出素子。

【請求項 10】

請求項 9 記載の生体分子検出素子において、前記電源回路は、前記アンテナで受信した電磁波を電力に変換し、各部に供給することを特徴とする生体分子検出素子。

【請求項 11】

請求項 1～10 のいずれか 1 項記載の生体分子検出素子を用いた核酸解析方法であって

前記プローブ固定化電極に前記生体分子プローブとして一本鎖核酸プローブを固定化するステップと、

少なくとも 1 種類の核酸を含む試料溶液を前記生体分子検出素子上に導入して、前記一本鎖核酸プローブとハイブリダイゼーションを行わせるステップと、

洗浄液を前記生体分子検出素子上に導入して、未反応の核酸を前記生体分子検出素子上から除去するステップと、

インターカレータ溶液を前記生体分子検出素子上に導入して、二本鎖となった核酸と反応させるステップと、

洗浄液を前記生体分子検出素子上に導入して、未反応のインターカレータを前記生体分子検出素子上から除去するステップと、

緩衝液を前記生体分子検出素子上に導入して、前記絶縁ゲート電界効果トランジスタの出力値を測定するステップと

を含むことを特徴とする核酸解析方法。

【請求項 12】

請求項 10 記載の生体分子検出素子を用いた生体分子解析方法であって、

反応容器に、前記プローブ固定化電極に前記生体分子プローブとしてそれぞれ異なる種類の一本鎖核酸プローブを固定化した複数の生体分子検出素子と緩衝液を入れ、各生体分子検出素子からの信号を外部受信機で受信するステップと、

少なくとも 1 種類の核酸を含む試料溶液を前記反応容器に導入して、前記一本鎖核酸プローブとハイブリダイゼーションを行わせるステップと、

インターカレータ溶液を前記反応容器に導入して、二本鎖となった核酸と反応させるステップと、

各生体分子検出素子からの信号を外部受信機で受信するステップと
を含むことを特徴とする核酸解析方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】生体分子検出素子及びそれを用いた核酸解析方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、遺伝子診断、DNA配列解析、あるいは遺伝子多型解析など、バイオテクノロジー、特に遺伝子検査分野の技術に関し、特に複数の異なる核酸を高精度に並列的に解析するのに適した生体分子検出素子、及びその素子を用いた核酸解析方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ヒトゲノムをはじめ各種生物のゲノム塩基配列の解読が急速に進展し、膨大な塩基配列情報が蓄積されつつある。今後は生体中における遺伝子の機能を明らかにすることにより、各種疾病の診断、医薬品の開発、農作物の品種改良など広範囲な分野で遺伝子関連技術の開発が飛躍的に進むものと思われる。これらの新規分野発展の基礎となるのが、塩基配列情報に加えて遺伝子の発現及び機能情報である。遺伝子の機能及び発現解析を大規模に行い、遺伝子検査へ発展させる技術として、DNAチップあるいはDNAマイクロアレイがAffymetrix社、Nanogen社などで開発されている。しかし、現状のDNAチップ/DNAマイクロアレイの多くは蛍光検出を基本原理としているので、レーザや複雑な光学系が必要となり、システムが大型化し高価である。

【0003】

これらの問題を解決する方法として、酸化・還元標識と組み合わせた電流検出方式のDNAチップがいくつか報告されている。Clinical Micro Sensors社では、分子ワイヤーと称する分子の一端を金属電極上に固定化して他端にDNAプローブを結合させ、ターゲット遺伝子とのハイブリダイゼーションに基づく酸化・還元標識と金属電極の電子の授受を電流変化として検出し、ターゲット遺伝子を検出する方式を開発している (Nature Biotechnology, vol. 16, (1998) p27, p40)。

【0004】

【非特許文献1】Nature Biotechnology, vol. 16, (1998) p27, p40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

現状のDNAチップ/DNAマイクロアレイの多くは蛍光検出を基本原理としているので、レーザや複雑な光学系が必要となり、システムが大型化し高価である。また、現在開発されている全てのDNAチップ/DNAマイクロアレイは、原則として1回のみの使用で廃棄される。洗浄して繰り返し使用できたとしても、せいぜい2回から3回の使用が限度である。このため多くの試料を用いた解析や、検体の数が多い遺伝子診断などの分野ではランニングコストが大きな問題となる。特に医療の分野では医療費抑制の観点からも、高額な検査が広く普及することは困難である。一方で、医療診断の分野、すなわち遺伝子診断の分野では高い精度、定量性が求められる。したがって、コスト低減と高精度化の両方を満足させる技術が求められる。

【0006】

上述の電気化学検出法は、高価なレーザや複雑な光学系を必要としないため、蛍光検出法に比べて装置システムが小型化され、低価格化が可能と考えられる。しかしながら、この方法は、金属電極上での酸化・還元反応を検出の基本原理としているため、試料中に酸化物質あるいは還元物質（例えばアスコルビン酸）が存在すると、酸化又は還元に基づく電流が流れ、遺伝子検出の妨害となって検出精度が劣化する。また、電流計測に伴い、金属電極上で電極反応が進行する。電極反応は不可逆で非平衡反応であるため、電極の腐食、ガスの生成などが生じ、電流測定の実定性が損なわれ特に繰り返し測定する場合に検出精度が劣化する。

【0007】

本発明は、低ランニングコスト・低価格システムでかつ高精度の測定が可能なDNAチ

ップ/DNAマイクロアレイシステムを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明では、電界効果トランジスタのゲートと電氣的に接続された金属表面に核酸などの生体関連物質から成るプローブを固定化し、目的物質とその金属表面で複合体を形成させ、その際に生ずる表面電荷密度の変化を、電界効果を利用して検出する。表面電荷密度の変化を大きくするために、生体物質自身が持っている電荷に加えて、インターカレータの導入やイオンなどの荷電粒子と複合体を組み合わせることにより、大きな信号／雑音比で表面電位変化の検出が可能となる。

【0009】

また、近年、ワイヤレス通信技術が進歩し、バーコードに相当するタグを集積化したワイヤレス通信チップが開発されている。このワイヤレス通信チップは、個々のチップを識別することができるため、流通管理用チップとしての使用が検討されている。このタグ付きワイヤレス通信チップをDNAチップとして用いる場合、ワイヤレス通信で電力を供給するため、低消費電力である必要がある。電圧計測方式は、電流計測方式より電力の消費が小さいため、ワイヤレス通信方式DNAチップに適している。

【0010】

本発明による生体分子検出素子は、絶縁膜中に埋設されたゲート電極を有する絶縁ゲート電界効果トランジスタと、絶縁膜の表面に形成され、生体分子プローブが固定化されたプローブ固定化電極と、ゲート電極とプローブ固定化電極とを電氣的に接続する接続配線とを備え、プローブ固定化電極に生体分子プローブが固定化された領域は、ゲート電極の直上位置から離れた位置にある。

【0011】

プローブ固定化電極はゲート電極の直上位置から絶縁膜の膜面に沿って生体分子プローブ固定化領域まで設けられ、接続配線はゲート電極の直上位置でプローブ固定化電極と接続されている構造とすることができる。あるいは、プローブ固定化電極はゲート電極の直上位置から離れた位置に設けられ、接続配線は絶縁膜中に膜面に沿って設けられている構造とすることもできる。

【0012】

生体分子プローブは核酸、ポリヌクレオチド又は合成オリゴヌクレオチドとすることができる。生体分子プローブは、一端がプローブ固定化電極の表面に固定化され、試料中の生体関連物質と特異的に結合・反応する。生体分子プローブを一本鎖プローブとし、そのプローブと相補鎖との特異結合を、特異結合によって形成された二本鎖部分にインターカレータを入り込ませることによって検出感度を上げることもできる。プローブ固定化電極は金、白金、パラジウム、チタン、クロム、アルミニウム、ポリシリコン、タンタル、モリブデン、又はこれらの材料を複数組み合わせた材料で作ることができる。絶縁膜中に送受信のアンテナを形成してもよい。

【0013】

本発明の生体分子検出素子は、また、共通の絶縁膜中に埋設されたゲート電極をそれぞれ有する複数の絶縁ゲート電界効果トランジスタと、絶縁膜の表面に形成され、生体分子プローブが固定化された複数のプローブ固定化電極と、複数の絶縁ゲート電界効果トランジスタの各ゲート電極と複数のプローブ固定化電極とをそれぞれ電氣的に接続する複数の接続配線とを備え、プローブ固定化電極に生体分子プローブが固定化された領域は、ゲート電極の直上位置から離れた位置にある。共通の絶縁膜中に送受信のアンテナを形成してもよい。また、演算回路、記憶回路、受信回路、送信回路、電源回路を設けるのが好ましい。その場合、電源回路は、アンテナで受信した電磁波を電力に変換し、各部に供給する構成をとるのが好ましい。これらは、いずれも既存の技術で作製可能である。

【0014】

本発明の生体分子検出素子を用いた核酸解析方法は、プローブ固定化電極に生体分子プローブとして一本鎖核酸プローブを固定化するステップと、少なくとも1種類の核酸を含

む試料溶液を生体分子検出素子上に導入して、一本鎖核酸プローブとハイブリダイゼーションを行わせるステップと、洗浄液を素子上に導入して、未反応の核酸を素子上から除去するステップと、インターカレータ溶液を素子上に導入して、二本鎖となった核酸と反応させるステップと、洗浄液を素子上に導入して、未反応のインターカレータを素子上から除去するステップと、緩衝液を素子上に導入して、絶縁ゲート電界効果トランジスタの出力値を測定するステップとを含む。

【0015】

本発明の生体分子検出素子を用いた核酸解析方法は、また、反応容器に、プローブ固定化電極に生体分子プローブとしてそれぞれ異なる種類の一本鎖核酸プローブを固定化した複数の生体分子検出素子と緩衝液を入れ、各素子からの信号を外部受信機で受信するステップと、少なくとも1種類の核酸を含む試料溶液を反応容器に導入して、一本鎖核酸プローブとハイブリダイゼーションを行わせるステップと、インターカレータ溶液を反応容器に導入して、二本鎖となった核酸と反応させるステップと、各生体分子検出素子からの信号を外部受信機で受信するステップとを含む。

【発明の効果】

【0016】

本発明の生体分子検出素子は、高価なレーザや複雑な光学検出系を必要としない。また、電流検出（アンペロメトリック）方式と異なり、平衡状態での表面電位を検出するので、基板の腐食やガスの発生、酸化／還元物質の妨害などによる信号値の不安定性は問題とならず、安定性に優れた高精度の生体物質検出が可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

以下、図面を参照して本発明の実施の形態を説明する。以下では、生体分子の例としてDNAを用いて説明する。

【0018】

〔第1の実施例〕

図1は、本発明による生体分子検出素子（生体分子検出用トランジスタ）の構成例を示す断面模式図である。

【0019】

シリコン基板1の表面にゲート絶縁膜2、ソース3、及びドレイン4を形成し、ソース、ドレイン間のゲート絶縁膜表面にゲート電極5を設けて絶縁ゲート電界効果トランジスタを製作する。ゲート電極5の表面にさらに絶縁膜を形成し、上記ゲート電極5が絶縁膜2の中に埋め込まれた構造とする。絶縁膜2にスルーホールを形成し、導電性材料で取り出し電極6を形成し、上記ゲート電極5と電氣的接触を形成する。さらにゲート絶縁膜表面にフローティング電極7を形成し、上記取り出し電極6と電氣的接触を形成する。フローティング電極7の表面にDNAプローブ8を固定化する。こうして製作された遺伝子トランジスタは、参照電極9とともに試料溶液10に浸漬して使用される。

【0020】

ゲート絶縁膜は、酸化シリコン（ SiO_2 ）、窒化シリコン（ SiN ）、酸化アルミニウム（ Al_2O_3 ）、酸化タンタル（ Ta_2O_5 ）などの材料を単独または組み合わせて用い、通常はトランジスタ動作を良好に保つため、酸化シリコン（ SiO_2 ）の上に窒化シリコン（ SiN ）、酸化アルミニウム（ Al_2O_3 ）あるいは酸化タンタル（ Ta_2O_5 ）を積層した二層構造とする。ゲート電極5の材料としてはポリシリコンが望ましく、ポリシリコンゲートを通してイオン注入によるソース、ドレインを形成する、いわゆるセルフアラインプロセスとの整合性がよい。取り出し電極6は、配線として用いるため、低抵抗でエッチングなど加工性の良い材料が好ましく、その材料としてはポリシリコン、アルミニウム、モリブデンなどを用いることができる。フローティング電極7は、試料溶液に直接接触するので、化学的安定性が高く、安定な電位を示し、かつ生体材料を固定化するため生体材料との親和性の高い材料が望ましく、金、白金、銀、パラジウムなどの貴金属を用いることができる。リフトオフ法などフローティング電極のパターン形成方法を用いること

により、取り出し電極とフローティング電極を、例えば金のような同じ材料で形成することもできる。

【0021】

本実施例の生体分子検出用トランジスタによると、DNAプローブ8を固定化する場所をトランジスタのソース、ドレイン間のチャンネル上に限る必要がなくなり、図1に示すようにフローティング電極7または取り出し電極6を延長することにより、チップ上の任意の場所に形成することができる。これにより、例えば試料溶液と接触するDNAプローブ形成領域と、電子回路が形成されるトランジスタ領域を分離してチップ上にレイアウトすることができ、信頼性の高い測定ができる。通常、生体分子検出用のチップは異なる生体分子を分離して固定化するため通常の半導体チップより大きく、スライドガラス程度の大きさ(26mm×76mm)のチップも開発されている。本発明の生体分子検出用トランジスタは低価格化を図るために5mm角程度と小さく設計するほうが好ましいが、スライドガラス程度の大きさのチップにも対応することができる。

【0022】

DNAプローブ(生体分子プローブ)8は、オリゴヌクレオチドまたはcDNAの断片を用い、通常300個以下の塩基から構成されている。オリゴヌクレオチドを用いる場合は、80個以下の塩基長の核酸断片であることが望ましい。DNAプローブ8をフローティングゲート電極7の表面に固定化するために、DNAプローブの一端をアミノ基(NH₂基)、チオール基(SH基)、ビオチンなどで化学修飾する。アミノ基で化学修飾したDNAプローブを用いる場合は、ゲート電極の表面をアミノプロピルエトキシシラン、ポリリジンなどで化学修飾してゲート表面にアミノ基を導入し、グルタルアルデヒドやフェニレンジイソシアネート(PDC)と反応させてアミノ基で化学修飾したDNAプローブをゲート表面に固定化する。チオール基で化学修飾したDNAプローブをゲート電極表面に固定化する場合は、ゲート電極に金を用い、チオール基と金との親和性を利用してDNAプローブを固定化する。また、ビオチンで化学修飾したDNAプローブを固定化する場合には、ゲート電極表面にストレプトアビジンを導入し、ビオチンとストレプトアビジンの親和性を利用して、DNAプローブをゲート表面に固定化する。実際の固定化に際しては、DNAプローブを含む溶液をフローティング電極表面にのみ滴下またはスポットし、DNAプローブを固定化する。

【0023】

生体分子検出用トランジスタのゲート電極表面で起こる化学反応に基づく電位変化を安定に測定するために、電位測定の基準となる参照電極9を設置する。参照電極は通常、所定組成・濃度の内部溶液に銀/塩化銀電極又はかんこう電極を浸漬した電極が用いられる。生体分子検出用トランジスタの電気的特性を変化させて動作点を調整するために、参照電極9に所定の電圧を印加することができる。

【0024】

試料中に測定すべきターゲット遺伝子を含む多数の遺伝子が存在し、生体分子検出用トランジスタのゲート上にターゲット遺伝子と相補的塩基配列を有するDNAプローブが固定化されていると、適切な反応条件のもとでターゲット遺伝子とDNAプローブがハイブリダイズして、ターゲット遺伝子とDNAプローブが複合体を形成する。反応に用いるバッファ溶液のpHの適切な条件下では、DNAは負に帯電している。したがって、ハイブリダイズによる複合体形成によりFETのゲート近傍で電荷密度が変化し、ゲートの表面電位が変化する。この変化がFETのゲート電圧変化と同等の作用となり、チャンネルの導電率を変化させる。したがって、ソース3及びドレイン4の間を流れるドレイン電流変化として複合体の形成、すなわちターゲット遺伝子の存在を検出することができる。

【0025】

本実施例の生体分子検出用トランジスタを用いた遺伝子解析の手順は、例えば次のようになる。

【0026】

まず反応容器に本発明の生体分子検出用トランジスタ、及び0.5mlの緩衝液を入れ

、トランジスタの信号を計測する。その後、以下の工程 (a) ~ (e) に従って遺伝子解析を行う。

(a) 少なくとも 1 種類の DNA を含む試料溶液を上記反応容器に導入して、導電性電極上の 1 本鎖 DNA プローブと所定の温度でハイブリダイゼーションを行わせる。

(b) 洗浄液を反応容器に導入して、未反応の DNA を基板上から除去する。

(c) インターカレータ溶液を反応容器に導入して、二本鎖となった DNA と反応させる。

(d) 洗浄液を反応容器に導入して、未反応のインターカレータを基板上から除去する。

(e) 緩衝液を反応容器に導入して、絶縁ゲート電界効果トランジスタの出力値を測定する。

簡便・迅速な測定のためには (b) (d) の工程をスキップすることもできる。

【0027】

〔第 2 の実施例〕

図 2 は、第 1 の実施例に示した生体分子検出用トランジスタを用いた遺伝子検査システムを示す模式図である。このシステムは、図 1 に示した生体分子検出用トランジスタ 11 の他に参照トランジスタ 12 を用い、2 つのトランジスタによる差動測定を行う。

【0028】

生体分子検出用トランジスタのゲート表面には試料中のターゲット遺伝子と相補的な塩基配列を有する DNA プローブ 8 が固定化されている。一方、参照トランジスタのゲート表面にはターゲット遺伝子の相補的な塩基配列とは異なる塩基配列を有する DNA プローブ 13 が固定化されている。生体分子検出用トランジスタと参照トランジスタの表面電位を安定に測定するために、電位測定の基準となる参照電極 9 を設置する。生体分子検出用トランジスタと参照トランジスタは駆動回路 14 によりそれぞれの表面電位を計測し、計測信号は差動測定回路 15 を介して信号処理回路 16 に入力される。

【0029】

このような差動測定を行うことにより、トランジスタの電気的特性の違いによる、周囲の温度や光の変化による出力値の変化を補償することができ、また試料中の荷電粒子がゲート上に非特異的に吸着することによる出力値の変化を相殺して、ターゲット遺伝子と DNA プローブのハイブリダイゼーションによる出力変化のみを精度良く検出することができる。

【0030】

生体分子検出用トランジスタと参照トランジスタは電気的特性がそろっていることが望ましいので、同じ基板に集積化された一対のトランジスタを用いることが望ましい。複数の生体分子検出用トランジスタを集積化して複数遺伝子を同時計測する場合、参照トランジスタを共通に使用することができ、異なる生体分子検出用トランジスタと共通の参照トランジスタとの差動測定を行う。

【0031】

〔第 3 の実施例〕

図 3 は、図 1 に示した生体分子検出用トランジスタを用いた測定システムの他の例を示す断面模式図である。この測定システムの場合、3 個の FET が集積化されており、第 1 の生体分子検出用トランジスタ 17 は第 1 のターゲット遺伝子を検出する生体分子検出用トランジスタ、第 2 のトランジスタ 18 は第 2 の遺伝子を検出する生体分子検出用トランジスタ、第 3 のトランジスタ 19 は参照トランジスタとして用いる。第 1、第 2 の生体分子検出用トランジスタのゲート電極上にはそれぞれ第 1、第 2 の遺伝子と相補的な塩基配列を有する DNA プローブが固定化されている。参照 FET のゲート電極表面には第 1 及び第 2 の遺伝子と相補的塩基配列とは異なる塩基配列を有する DNA プローブが固定化されている。

【0032】

図 3 は、第 1 の遺伝子のみを含有する試料溶液を上記集積化トランジスタに導入し、ターゲット遺伝子とハイブリダイゼーションを行わせた後、インターカレータを作用させた

ときの状態を示している。第1の遺伝子は第1の生体分子検出用トランジスタ17のDNAプローブとのみハイブリダイズして二本鎖を形成する。インターカレータ20は二本鎖のDNAとのみ反応して結合し、一本鎖のDNAには結合しない。インターカレータは電荷を有しているため、第1の生体分子検出用トランジスタ17の表面電荷密度のみが変化してトランジスタの出力信号が変化し、第2の生体分子検出用トランジスタ18及び参照トランジスタ19の表面電荷密度は変化しないので出力信号が変化しない。したがって、第1の生体分子検出用トランジスタ17と参照トランジスタ19の差動測定、及び第2の生体分子検出用トランジスタ18と参照トランジスタ19の差動測定を行うことにより、前者の出力信号のみが変化して第1のターゲット遺伝子が検出される。インターカレータとしてはエチジウムブロマイド、ヘキスト33258 (Hoechst 33258)、ピコグリーンなどを用いることができる。

【0033】

次に、測定例について説明する。アルコールデヒドロギナーゼ関連遺伝子には一塩基多型 (SNPs) が存在することが知られており、その一塩基多型部位をはさんで前後8塩基を有する17塩基長の第一及び第二のDNAプローブを合成した。その塩基配列を下に示す。

第1 DNA プローブ: 5'-CATACACTAAAGTGAAA-3' (配列番号1)

第2 DNA プローブ: 5'-CATACACTGAAGTGAAA-3' (配列番号2)

【0034】

5' 末端から9番目の部位がSNP部位であり、第1 DNA プローブではその部位の塩基がA、第2プローブではGとなっている。この第1及び第2のDNAプローブをそれぞれ第1及び第2のトランジスタのゲートに接続されたフローティング電極上に固定化した。DNAプローブの固定化に当たっては、DNAプローブの5' 末端をチオール基で修飾した。一方、本実施例のFETのゲートに接続されたフローティング電極には金のフローティング電極が用いられており、その表面に上記DNAプローブを固定化した。参照用トランジスタのゲートに接続されたフローティング電極には第1、第2のDNAプローブと異なる配列を有するDNAプローブとして、ここでは全てAから構成される17塩基長のDNAプローブを合成し、固定化した。参照用トランジスタのゲートに接続されたフローティング電極上にはDNAプローブを固定化しなくても良い。

【0035】

試料は血液中の白血球からヒトゲノムを抽出し、上記SNP部位を含む100塩基長の領域を増幅した後、第1、第2の生体分子検出用トランジスタ、及び参照トランジスタに導入して、45℃で8時間、ハイブリダイゼーションを行わせた。ハイブリダイゼーション後、緩衝液により洗浄して未反応の試料を除去し、インターカレータを導入した。測定に当たっては、まず第1、第2の生体分子検出用トランジスタ、及び参照トランジスタに緩衝液を導入し、それぞれのトランジスタの出力電圧、第1の生体分子検出用トランジスタと参照用トランジスタの差動出力、及び第2の生体分子検出用トランジスタと参照用トランジスタの差動出力を測定した。その後、試料を導入し、ハイブリダイゼーション、洗浄の後、インターカレータとしてヘキスト33258 (Hoechst 33258) を導入し、それぞれのトランジスタの出力電圧、第1の生体分子検出用トランジスタと参照用トランジスタの差動出力、及び第2の生体分子検出用トランジスタと参照用トランジスタの差動出力を測定した。こうして、試料及びインターカレータ導入前後の出力電圧の変化を測定した。

【0036】

測定結果は以下の通りであった。第1のDNAプローブに対応する塩基配列を有する試料 (Normal) では、試料溶液導入後及びインターカレータ導入後の第1の生体分子検出用トランジスタと参照用トランジスタの差動出力はそれぞれ15.0 mV及び-12.0 mVであった。DNAは溶液中で負に帯電しているため、nチャネルFETの出力は正の方向にシフトする。一方、インターカレータは溶液中で正に帯電しているため、FETの出力は負方向にシフトする。一方、第2の生体分子検出用トランジスタと参照用トランジスタの差動出力は試料溶液導入後及びインターカレータ導入後でそれぞれ1.5 mV及び-

0.5 mVであり、有意な差が得られた。インターカレータは二本鎖DNAとのみ反応し、DNAと電荷が逆であるため、フローティング電極上に非特異的に吸着した一本鎖DNAには応答せず、一本鎖DNAの非特異的吸着による信号とハイブリダイゼーションによる二本鎖DNAに基づく信号を明確に区別することができる。

【0037】

第2のDNAプローブに対応する塩基配列を有する試料 (Mutant) では、試料溶液導入後及びインターカレータ導入後の第1の生体分子検出用トランジスタと参照用トランジスタの差動出力はそれぞれ2.3 mV及び0.7 mVであった。一方、第2の生体分子検出用トランジスタと参照用トランジスタの差動出力はそれぞれ11.0 mV及び-8.0 mVであり、やはり有意な差が得られた。

【0038】

第1と第2のDNAプローブに対応する塩基配列を半分ずつ有する試料 (ヘテロ) では試料溶液導入後及びインターカレータ導入後の第1の生体分子検出用トランジスタと参照用トランジスタの差動出力は6.5 mV及び-4.8 mV、第2の生体分子検出用トランジスタと参照用トランジスタの差動出力はそれぞれ5.5 mV及び-4.5 mVであり、ほぼ1対1の比が得られた。

【0039】

以上より、本発明によるSNP解析により、Normal/Normalのホモ、Mutant/Mutantのホモ、Normal/Mutantのヘテロの3種類の試料を識別することができた。インターカレータ使用の場合は、試料DNAに標識化合物を化学結合して標識する必要がない。

【0040】

〔第4の実施例〕

図4及び図5は、本発明による生体分子検出用トランジスタの他の構成例を示す模式図である。この生体分子検出用トランジスタは、図3に示した生体分子検出用トランジスタのゲート絶縁膜2中に、送受信用のアンテナ21を組み込んだものに相当する。アンテナ21はゲート電極5の形成時に同時に形成することもできる。アンテナはオンチップに埋め込んだ送受信回路の素子22に接続されている。また、本実施例では参照電極9の材料としてTiの上にPtを積層した構造の電極を用い、直接に基板上に形成されている。

【0041】

本実施例では取り出し電極6を絶縁膜2の中に埋め込んで延長し、その端部にフローティング電極7を形成してある。図5に本実施例の平面図を示す。トランジスタのソース3、ドレイン4、DNAプローブ8及び13、アンテナ21をそれぞれ分離してチップ上にレイアウトすることができ、かつチップの表面に露出しているのはフローティング電極7、DNAプローブ8及び13、及び絶縁膜2のみであり、トランジスタ部、アンテナ部は絶縁膜2で保護されている構造である。生体分子検出用トランジスタで測定した信号を上記アンテナにより外部の受信機に送信して信号処理することができる。上記アンテナは絶縁膜2に埋め込まれた構造であるため、直接に試料溶液と接触することがなく、溶液による腐食や蛋白質の吸着による特性の変化がなく、信頼性の高い測定に適している。

【0042】

図6に、本実施例による生体分子検出用トランジスタとワイヤレス通信機能を担うチップを集積化した例を示す。1 mm角のシリコン基板1に生体分子検出用トランジスタのソース3、ドレイン4を形成し、取り出し電極6によりフローティング電極7とゲートを接続する。フローティング電極上にDNAプローブ8を固定化する。上記シリコン基板上にアンテナ21、演算回路23、記憶回路24、受信回路25、送信回路26、電源回路27を集積化した構成である。試料中に相補的な配列を有するターゲットDNAが存在すると、フローティング電極7上でDNAプローブとハイブリダイズし、二本鎖を形成する。この二本鎖の形成を電界効果トランジスタで検出する。記憶回路24には個々のチップ基板を区別する識別情報、DNAプローブの配列情報、コードする蛋白質情報などが記憶されており、ハイブリダイズ反応の結果の情報とともに上記情報をアンテナ、送信回路により外部の受信装置に送信する。チップ外部から送られる電磁波をアンテナで受信し、受信

回路、電源回路によりチップで使用可能な電力に変換して電界効果トランジスタ、送信回路、記憶回路などの各素子へ供給して動作させる。

【0043】

本実施例ではハイブリダイズの結果とともに各チップを識別する情報を同時に取得できるので、図7に示すように複数のチップを同時に試料中で反応させることができる。まず反応容器28に本発明の生体分子検出用トランジスタ29、及び0.5mlの緩衝液を入れトランジスタの信号を計測して外部受信機にその信号を送信する。その後、以下の工程(a)～(f)に従って遺伝子解析を行う。

(a) 少なくとも1種類のDNAを含む試料溶液を上記反応容器に導入して、導電性電極上の1本鎖DNAプローブと所定の温度でハイブリダイゼーションを行わせる。

(b) 洗浄液を反応容器に導入して、未反応のDNAを基板上から除去する。

(c) インターカレータ溶液を反応容器に導入して、二本鎖となったDNAと反応させる。

(d) 洗浄液を反応容器に導入して、未反応のインターカレータを基板上から除去する。

(e) 緩衝液を反応容器に導入して、絶縁ゲート電界効果トランジスタの出力値を測定する。

(f) 出力値をアンテナで受信機に送信する。

【0044】

上記2回の測定による生体分子検出用トランジスタの出力値の差が、ハイブリダイズによって形成された二本鎖DNAの信号である。生体分子検出用トランジスタの信号計測には外部の送受信装置30との間で例えば13.56MHzの電磁波を用いて行う。記憶回路の情報を参照することにより、試料中に存在するDNAの種類、型、配列などを解析することができる。また本チップはワイヤレス通信で情報の送受信や電力の供給を行っているので、チップと外部回路との配線が不要となり、直接にチップを試料中に入れて測定することができるため、簡便な測定系を構築することができる。なお、実験条件によっては、上記洗浄工程(b)(d)を省略し、試料溶液中に生体分子検出用トランジスタを浸漬した状態で全ての測定を完了することも可能である。

【図面の簡単な説明】

【0045】

【図1】本発明の電界効果トランジスタとフローティングゲート電極を用いる生体分子検出用トランジスタを説明する図。

【図2】本発明の生体分子検出用トランジスタを用いた遺伝子検出回路を説明する図。

【図3】本発明の生体分子検出用トランジスタとインターカレータを組み合わせたシステムを説明する図。

【図4】本発明の生体分子検出用トランジスタとアンテナとの集積化を説明する図。

【図5】本発明の生体分子検出用トランジスタとアンテナとの平面配置を説明する図。

【図6】本発明の生体分子検出用トランジスタとワイヤレス通信チップとを集積化したシステムを説明する図。

【図7】本発明の生体分子検出用トランジスタを用いた遺伝子解析システムを説明する図。

【符号の説明】

【0046】

1…シリコン基板、2…絶縁膜、3…ソース、4…ドレイン、5…ゲート電極、6…取り出し電極、7…フローティング電極、8…DNAプローブ、9…参照電極、10…試料溶液、11…生体分子検出用トランジスタ、12…参照トランジスタ、13…参照用DNAプローブ、14…トランジスタ駆動回路、15…差動増幅回路、16…信号処理回路、17…第一の生体分子検出用トランジスタ、18…第二の生体分子検出用トランジスタ、19…参照トランジスタ、20…インターカレータ、21…アンテナ、22…送受信回路

素子、2 3 …演算回路、2 4 …記憶回路、2 5 …受信回路、2 6 …送信回路、2 7 …電源回路、2 8 …反応容器、2 9 …生体分子検出用トランジスタチップ、3 0 …受信装置

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> National Institute for Material Science
HITACHI, Ltd.

<120> An element for detecting biological molecules and a
method of nucleic acid analysis using the element

<130> P03-0686

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 1

catacactaa agtgaaa

17

<210> 2

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

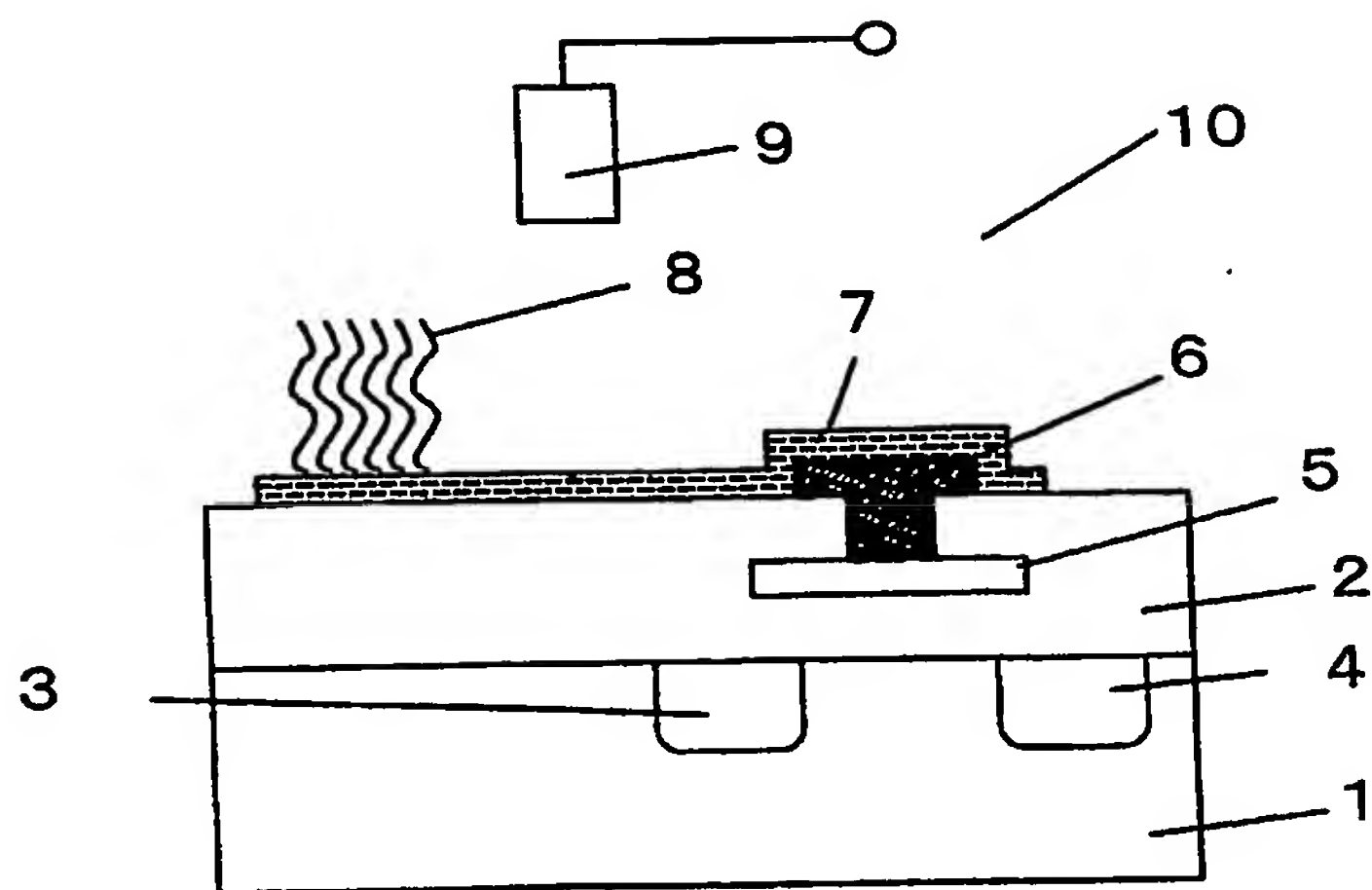
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 2

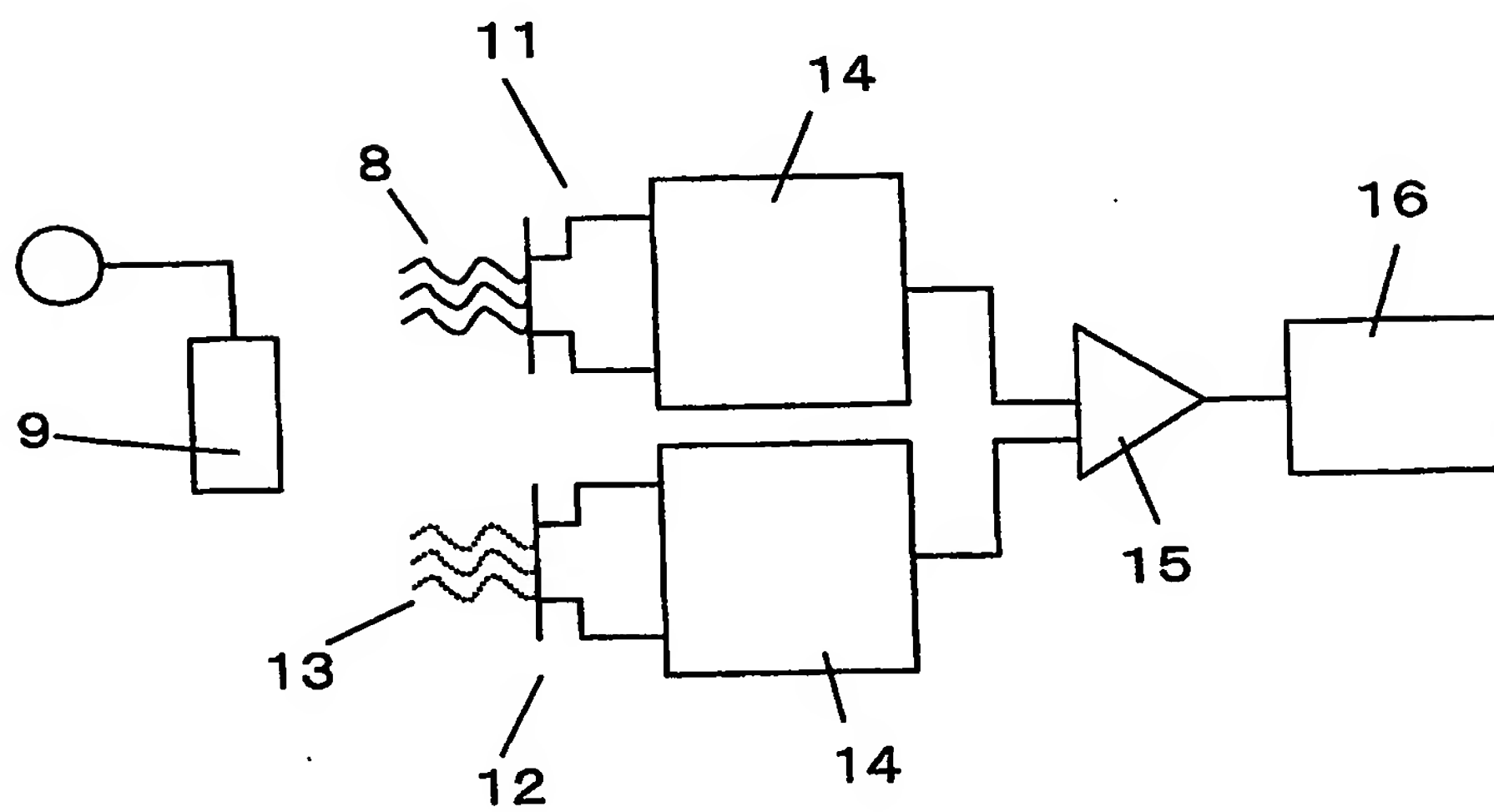
catacactga agtgaaa

17

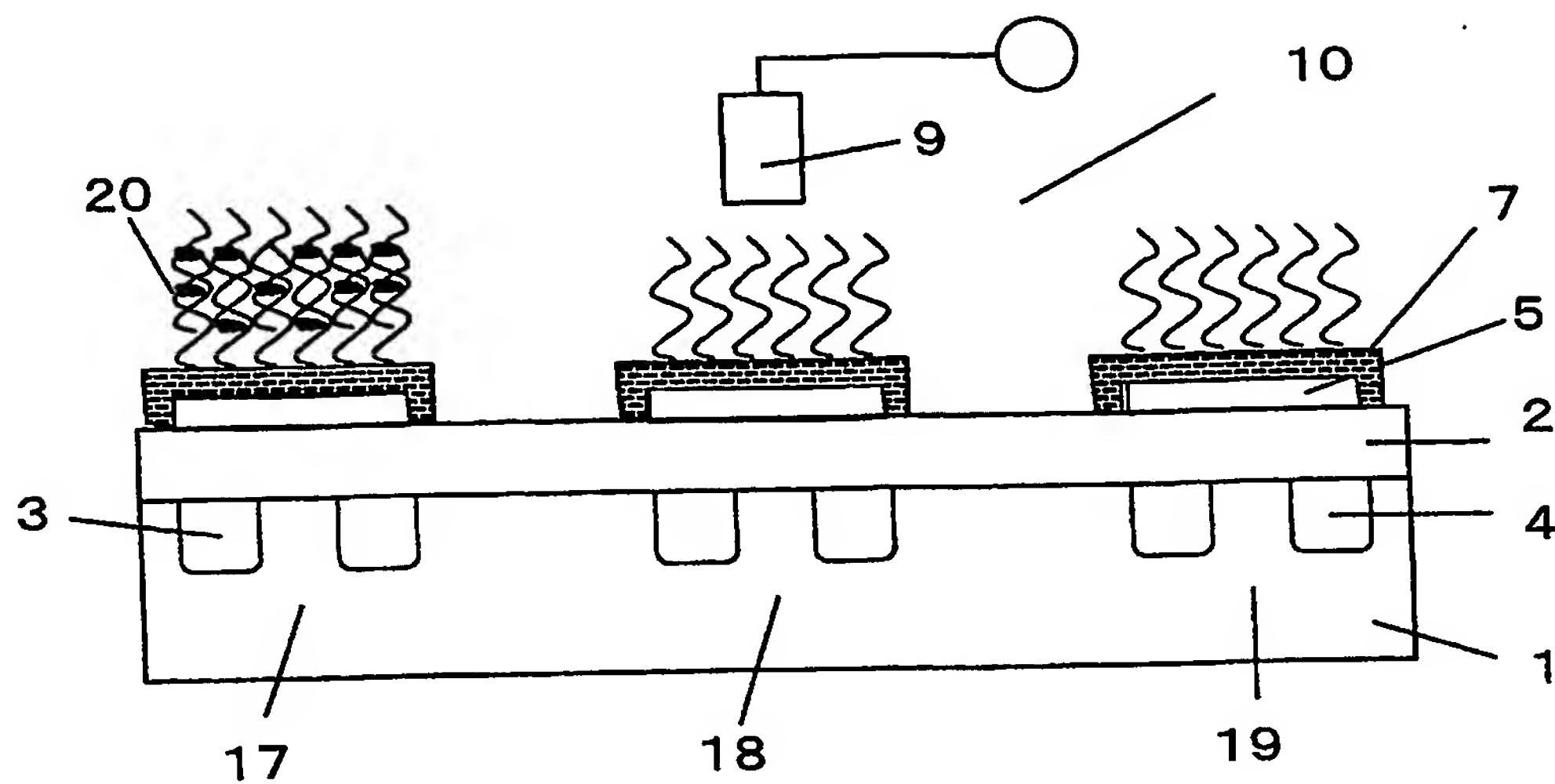
【書類名】 図面
【図 1】



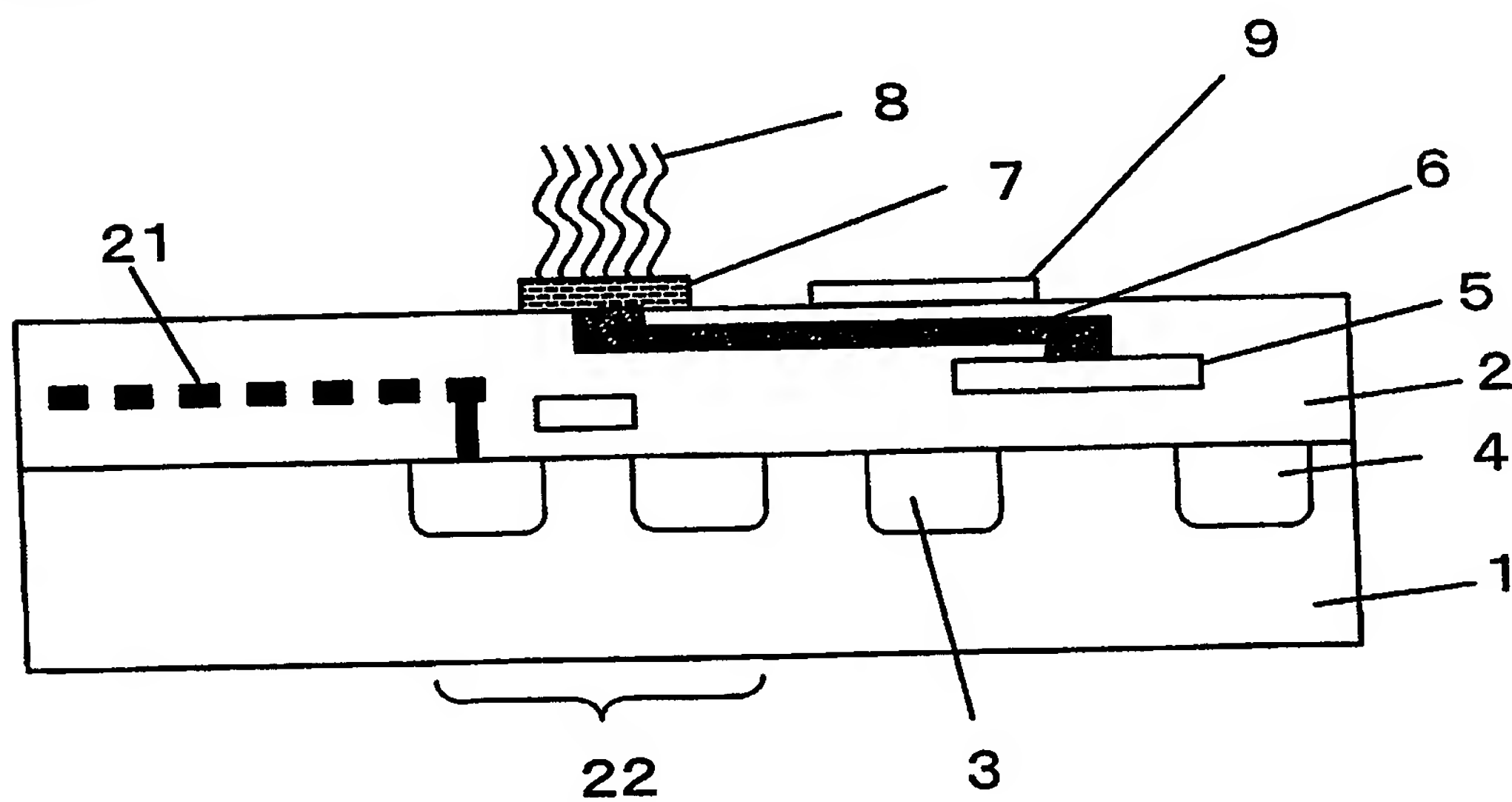
【図 2】



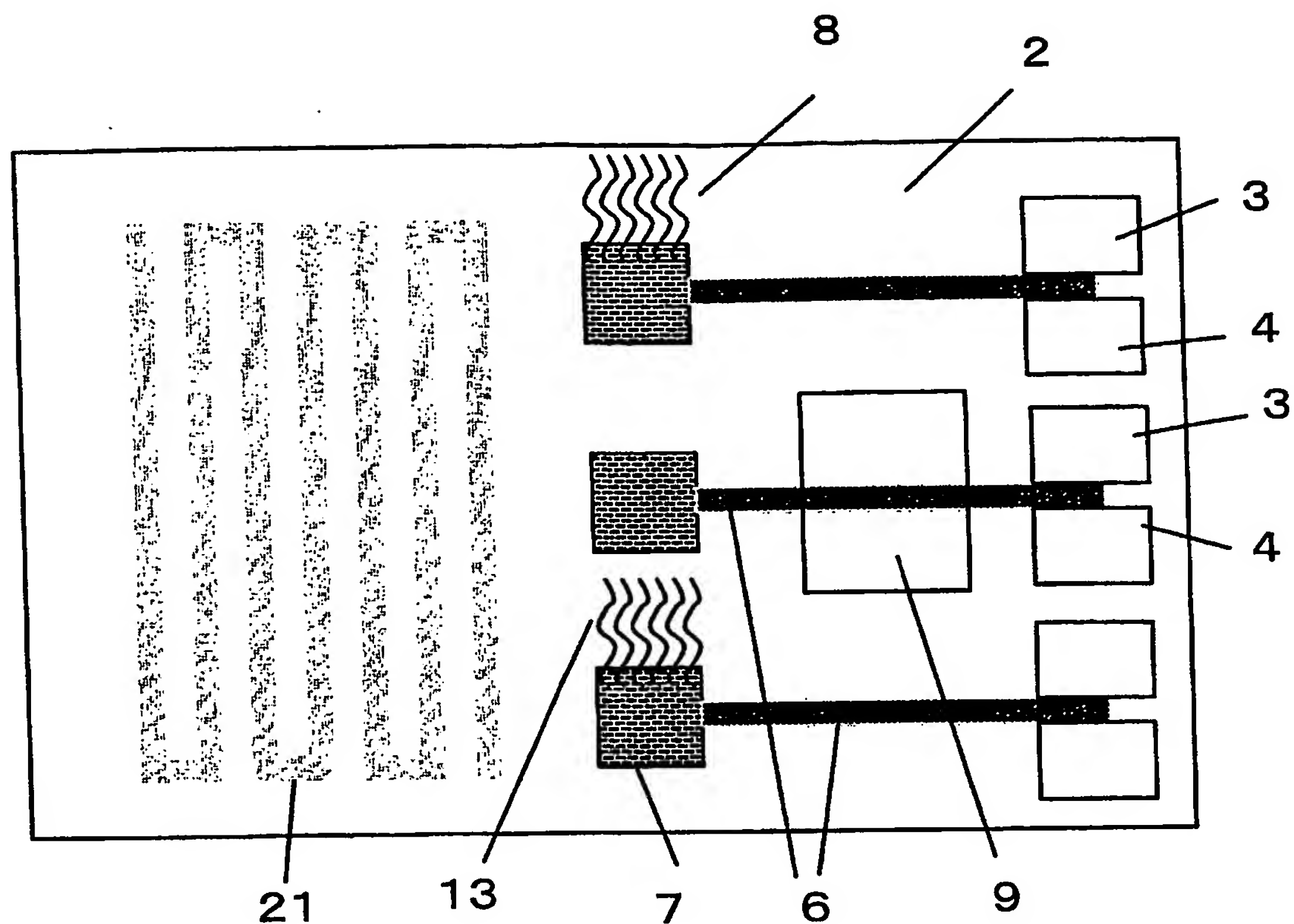
【図 3】



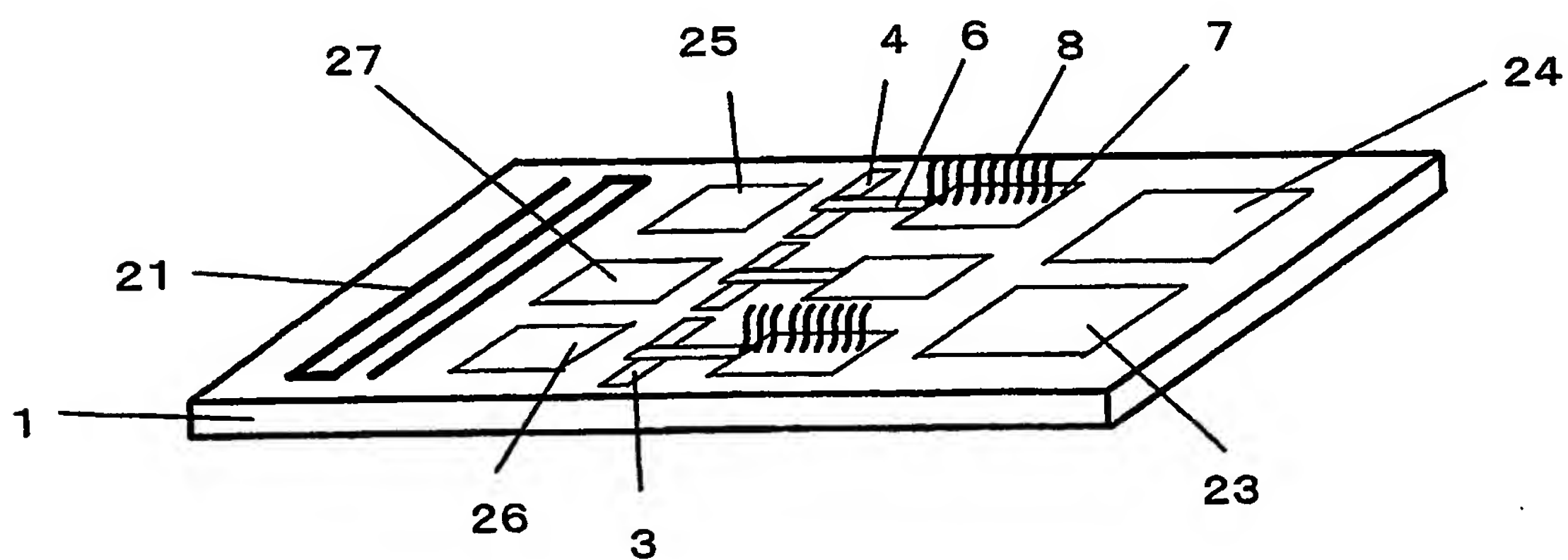
【図 4】



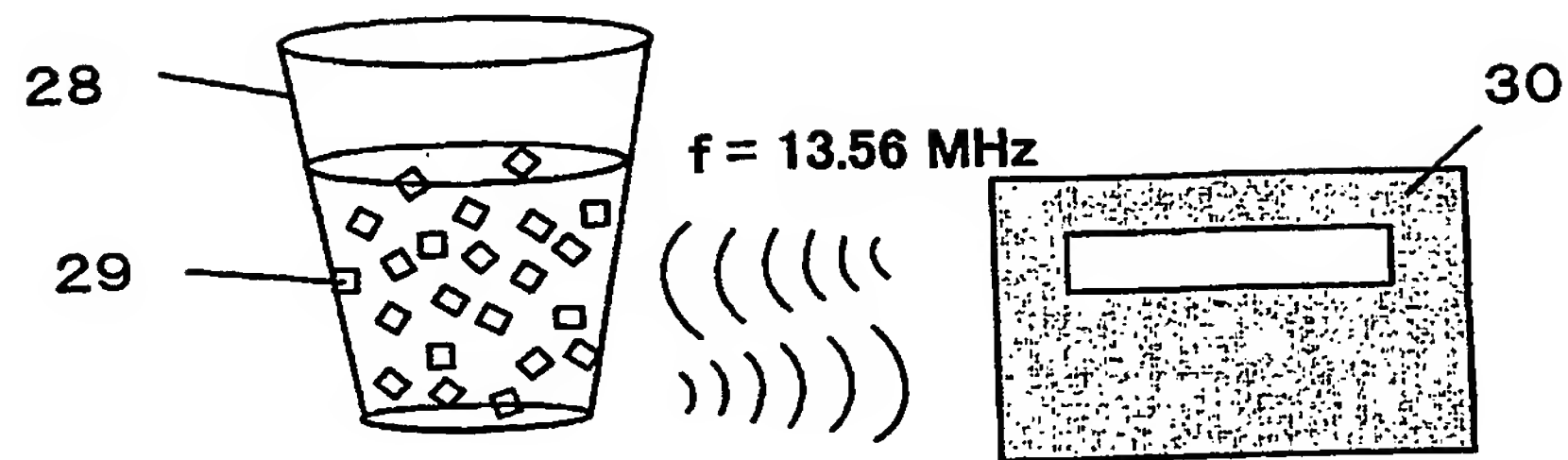
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【書類名】 要約書

【要約書】

【要約】

【課題】 低ランニングコスト・低価格システムでかつ高精度の測定が可能なDNAチップ/DNAマイクロアレイシステムを提供する。

【解決手段】 電界効果トランジスタのゲート電極5に接続されたフローティング電極7の表面にDNAプローブ8を固定化し、ターゲット遺伝子とフローティング電極の表面でハイブリダイゼーションを行わせ、その際に生ずる表面電荷密度の変化を電界効果を利用して検出する。

【選択図】 図1

特願 2 0 0 3 - 3 0 6 9 0 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[3 0 1 0 2 3 2 3 8]

1. 変更年月日

2 0 0 1 年 4 月 2 日

[変更理由]

新規登録

住 所

茨城県つくば市千現一丁目 2 番 1 号

氏 名

独立行政法人物質・材料研究機構

特願 2 0 0 3 - 3 0 6 9 0 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 5 1 0 8]

1. 変更年月日 1 9 9 0 年 8 月 3 1 日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都千代田区神田駿河台 4 丁目 6 番地
氏 名 株式会社日立製作所
2. 変更年月日 2 0 0 4 年 9 月 8 日
[変更理由] 住所変更
住 所 東京都千代田区丸の内一丁目 6 番 6 号
氏 名 株式会社日立製作所